

ORIGINAL ARTICLE

Potensi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga* L.) dalam Menghambat Pembentukan Biofilm *Fusobacterium nucleatum*Ozhan Faizal¹, Mutia Rochmawati^{1*}, Dwi Nur Indah Sari¹, Eka Prasasti Nur Rachmani², Maulina Triani¹

1. Jurusan Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia
 2. Jurusan Farmasi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia
- Correspondence e-mail to: mutia.rochmawati@unsoed.ac.id

ABSTRAK

Latar belakang : *Fusobacterium nucleatum* merupakan bakteri penyebab periodontitis dan termasuk kelompok bakteri *orange complex* pada biofilm. Akumulasi biofilm dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti gingivitis, periodontitis, nekrosis jaringan, dan infeksi pada jaringan. Permasalahan yang disebabkan oleh biofilm dapat dicegah melalui terapi mekanis dan pemberian obat kumur *chlorhexidine gluconate* 0,2%, namun penggunaan dalam jangka panjang memiliki efek samping seperti *staining*, *xerostomia*, dan erosi gigi. Fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur merupakan bahan herbal sebagai alternatif terapi adjuvan karena mengandung senyawa aktif antibiofilm. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur dalam menghambat pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum*. **Metode :** Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur (5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, dan 25 mg/mL), kontrol positif *chlorhexidine gluconate* 0,2%, dan kontrol negatif DMSO 1%. Uji penghambatan pembentukan biofilm dilakukan menggunakan metode *microtiter plate assay* dengan pewarnaan kristal violet 1% dibaca pada panjang gelombang 595 nm. Data dianalisis menggunakan *One-way ANOVA* dan uji *post hoc LSD*, dan nilai MBIC₅₀ diuji dengan analisis probit. **Hasil :** Uji fitokimia menunjukkan hasil bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur mengandung senyawa flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, dan fenol. Fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur efektif dalam menghambat pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* dengan nilai MBIC₅₀ 7,3 mg/mL dan persentase penghambatan pembentukan biofilm semakin meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi. Fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur konsentrasi 25 mg/mL merupakan konsentrasi efektif. **Simpulan:** Fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur efektif menghambat biofilm *Fusobacterium nucleatum*.

Key words: Biofilm, *Fusobacterium nucleatum*, Fraksi Etil Asetat, Rimpang Kencur

Potential of Ethyl Acetate Fraction of Ethanol Extract of Kencur Rhizomes (*Kaempferia galanga* L.) in Inhibiting *Fusobacterium nucleatum* Biofilm FormationOzhan Faizal¹, Mutia Rochmawati^{1*}, Dwi Nur Indah Sari¹, Eka Prasasti Nur Rachmani², Maulina Triani¹

1. Jurusan Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia
 2. Jurusan Farmasi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia
- Correspondence e-mail to: mutia.rochmawati@unsoed.ac.id

ABSTRACT

Background : *Fusobacterium nucleatum* is a bacterium that causes periodontitis and belongs to the orange complex bacteria in biofilm. Biofilm accumulation can lead to various diseases such as gingivitis, periodontitis, tissue necrosis, and tissue infections. Biofilm-related issues can be prevented through mechanical therapy with the use of 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash, however, long-term use may result in side effects such as tooth staining, xerostomia, and tooth erosion. The ethyl acetate fraction of *Kaempferia galanga* L. ethanol extract is an herbal material that can serve as an adjunctive therapy because it contains active compounds that can inhibit biofilm formation. This research was to investigate the activity of the ethyl acetate fraction of *Kaempferia galanga* L. ethanol extract in inhibiting *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation. **Methods :** In this study, there were 5 treatment groups of ethyl acetate fraction of *Kaempferia galanga* L. ethanol extract (5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, and 25 mg/mL), positive control of 0.2% chlorhexidine gluconate, and negative control of 1% DMSO. The inhibition of biofilm formation was tested using the microtiter plate assay method with 1% crystal violet staining read at a wavelength of 595 nm. Data were

analyzed using One-way ANOVA and LSD post hoc test, and MBIC50 values were tested using probit analysis. **Results :** Phytochemical analysis showed that the ethyl acetate fraction of *Kaempferia galanga L.* ethanol extract contains flavonoids, saponins, alkaloids, tannins, and phenols. ethyl acetate fraction of *Kaempferia galanga L.* ethanol extract is effective in inhibiting *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation with MBIC50 value of 7.3 mg/mL. The percentage of inhibition of biofilm formation increased with increasing concentration. The ethyl acetate fraction of *Kaempferia galanga L.* ethanol extract concentration 25 mg/mL was the effective dose. **Conclusio:** The ethyl acetate fraction of *Kaempferia galanga L.* ethanol extract effectively inhibits *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation

Key words: Biofilm, *Fusobacterium nucleatum*, Ethyl Acetate Fraction, *Kaempferia galanga*

PENDAHULUAN

Penyakit periodontal merupakan penyakit gigi dan mulut yang sangat sering dikeluhkan oleh masyarakat Indonesia dan memiliki prevalensi cukup tinggi. Penyakit periodontal memiliki prevalensi sebesar 11,2% ditinjau dari 187 negara dan diderita oleh 743 juta orang di dunia [1]. Data Riskesdas tahun 2018 menunjukkan prevalensi penyakit periodontal pada masyarakat Indonesia adalah sebesar 74,1%, yang artinya penyakit periodontal merupakan salah satu penyakit gigi dan mulut yang sering ditemui di Indonesia. Penyakit periodontal yang memiliki prevalensi tertinggi adalah periodontitis [2].

Periodontitis adalah kondisi inflamasi jaringan periodontal yang mengakibatkan terjadinya destruksi pada ligamen periodontal dan tulang alveolar, dan ditandai dengan terbentuknya poket periodontal, resesi gingiva, atau keduanya yang pada akhirnya menyebabkan avulsi gigi. Etiologi utama penyebab periodontitis antara lain bakterial plak yang terdapat dalam poket periodontal terutama pada pasien dengan *oral hygiene* buruk [2].

Bakterial plak pada rongga mulut terbentuk oleh biofilm yang berfungsi melindungi mikroba dari agen disinfektan atau antibiotik. Bakteri yang berperan dalam membentuk biofilm oral dan menyebabkan periodontitis kronis adalah *Porphyromonas gingivalis* [3]. Bakteri *Fusobacterium nucleatum* merupakan salah satu bakteri Gram negatif dengan prevalensi tinggi pada penyakit periodontal setelah *Porphyromonas gingivalis*, yaitu dengan persentase sebanyak 55%. *Fusobacterium nucleatum* merupakan bakteri anaerob yang termasuk kelompok bakteri *orange complex* pada biofilm penyebab periodontitis. *Fusobacterium nucleatum* memiliki peran krusial dalam menjembatani bakteri kolonisasi awal (*Streptococcus* dan *Actinomyces*) dan bakteri kolonisasi akhir (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) selama pembentukan plak biofilm subgingiva. Bakteri *Fusobacterium nucleatum* memiliki *autoinducer-2* (AL-2) tinggi yang berperan dalam *quorum sensing* pembentukan biofilm [4]. *Fusobacterium nucleatum* muncul dengan jumlah yang tinggi pada waktu 24 jam setelah munculnya plak dan dapat memperbanyak diri selama 48 jam pada plak dental. Peningkatan jumlah *Fusobacterium nucleatum* dapat menyebabkan periodontitis yang ditandai dengan adanya inflamasi gingiva, pendalaman poket dan kerusakan jaringan periodontal [5].

Permasalahan yang disebabkan oleh biofilm oral dapat dicegah melalui terapi mekanis seperti menyikat gigi, *dental flossing*, dan terapi adjuvant berupa pemberian obat kumur. *Gold standard* dari bahan obat kumur sebagai antibiofilm yaitu *chlorhexidine gluconate* 0,2%. Namun, penggunaan *chlorhexidine gluconate* 0,2% dalam jangka panjang dapat menyebabkan efek samping seperti *staining*, xerostomia, dan erosi gigi. Efek samping dari *chlorhexidine gluconate* itu mengakibatkan dewasa ini banyak dikembangkan terapi adjuvan dengan bahan dasar tanaman obat yang diyakini mempunyai khasiat antibakteri dan antibiofilm dengan efek samping minimal, salah satunya adalah rimpang kencur [6].

Kencur adalah tanaman tropis yang sangat umum ditemui di Indonesia dan telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia sebagai bahan obat – obatan, bumbu masakan, dan sebagai makanan atau minuman. Pada bidang kedokteran gigi, kencur juga sudah banyak diteliti memiliki manfaat sebagai antibakteri, antiinflamasi, dan juga antibiofilm [7]. Ekstrak etanol rimpang kencur terbukti dapat menghambat pertumbuhan berbagai bakteri ditandai dengan terbentuknya zona hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, dan *Klebsiella pneumonia*. Penelitian yang dilakukan oleh Fajeriati dan Andika (2017) menunjukkan bahwa ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) memiliki daya antibakteri yang kuat terhadap bakteri Gram negatif *E. coli* [8]. Penelitian lain yang dilakukan oleh Saputri *et al*, (2023) menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) dengan dosis 25 mg/mL efektif untuk mendegradasi biofilm dari bakteri *Fusobacterium nucleatum* [4].

Rimpang kencur memiliki banyak sekali senyawa di dalamnya, sehingga perlu untuk dilakukan fraksinasi. Fraksinasi dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan kandungan senyawa utama dari golongan senyawa yang lain. Pemisahan terhadap fraksi dilakukan dengan memperhatikan sifat-sifat senyawa yang dikehendaki. Fraksinasi umumnya dilakukan menggunakan pelarut dengan polaritas yang berbeda sehingga senyawa yang bersifat polar akan masuk kedalam pelarut polar sedangkan senyawa non polar akan masuk kedalam pelarut non polar [9]. Metode pemisahan yang digunakan umumnya adalah fraksinasi cair-cair, yaitu metode pemisahan dengan menggunakan dua cairan pelarut yang tidak saling bercampur, sehingga senyawa yang diinginkan dapat terpisah. Terdapat berbagai senyawa yang dapat digunakan untuk melakukan fraksinasi, namun pada penelitian ini peneliti memilih untuk menggunakan bahan etil asetat karena sifatnya yang semi polar, sehingga akan lebih efektif karena mampu untuk melarutkan semua senyawa fitokimia yang bersifat polar maupun non-polar yang terkandung pada rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) [10].

Efektivitas dari ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) fraksi etil asetat terhadap penghambatan

pembentukan biofilm bakteri patogen periodontitis *Fusobacterium nucleatum* belum pernah diteliti sebelumnya, oleh karena itu penelitian ini meneliti tentang efektivitas dari ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) fraksi etil asetat terhadap degradasi biofilm bakteri *Fusobacterium nucleatum*. Penelitian mengenai antibiofilm sangat penting dilakukan karena biofilm bakteri dapat lebih menggambarkan sistem biologis dan metabolisme bakteri di dalam ekosistem alami bakteri pada *host*, dibandingkan bakteri planktonik.

METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris secara *in vitro* dengan rancangan penelitian adalah *post-test only with control group design*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman. Penelitian ini dibagi menjadi 7 kelompok, yaitu kelompok perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur konsentrasi 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, dan 25 mg/mL, kontrol positif *chlorhexidine gluconate* 0,2%, dan kontrol negatif DMSO 1% dengan pengulangan masing-masing kelompok sebanyak 4 kali. Fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur dibuat menggunakan metode fraksinasi cair-cair menggunakan tiga pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu n- heksan, etil asetat, dan etanol.

Pembuatan Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Etanol Rimpang Kencur

Rimpang kencur diambil dari Desa Cirahab, Kecamatan Lumbr, Kabupaten Banyumas. Pembuatan ekstrak etanol rimpang kencur dilakukan menggunakan metode maserasi. Simplisia yang digunakan sebanyak 12 kg dan pelarut etanol 70% sebanyak 12 liter. Perendaman simplisia menggunakan pelarut etanol 70% dilakukan selama 3x24 jam dengan pengadukan yang dilakukan setiap harinya. Pelarut diganti pada 24 jam pertama dan kedua dengan dilakukan penyaringan. Hasil penyaringan digabungkan dalam satu wadah kemudian diuapkan dengan *waterbath*. Fraksinasi dilakukan menggunakan dua pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu n-heksan dan etil asetat. Larutan ekstrak etanol rimpang kencur kemudian dimasukkan dalam corong pisah menggunakan pelarut n-heksan dengan perbandingan 1:2. Corong kemudian dikocok secara perlahan agar larutan homogen lalu ditunggu hingga memisah 2 lapisan. Lapisan atas mengandung pelarut n-heksana (fraksi n-heksan) dan lapisan bawah mengandung pelarut etanol. Lapisan bawah kemudian dilakukan fraksinasi kembali menggunakan cara yang sama dengan pelarut etil asetat. Lapisan atas mengandung pelarut etil asetat (fraksi etil asetat) dan lapisan bawah disebut fraksi residu. Fraksi etil asetat kemudian diuapkan dengan *waterbath* untuk mendapatkan fraksi etil asetat kental. Hasil fraksi kemudian dilakukan uji fitokimia untuk melihat senyawa metabolit yang ada di dalamnya dan dibuat menjadi 5 variasi konsentrasi (5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, dan 25 mg/mL) menggunakan pelarut DMSO 1%.

Pembuatan Suspensi Bakteri *Fusobacterium nucleatum*

Larutan BHI-B sebanyak 2 mL dan 1 ose *Fusobacterium nucleatum* dicampurkan dalam tabung reaksi dan steril kemudian dihomogenkan. Tabung reaksi tersebut dimasukkan ke dalam desicator kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam dengan suhu 37°C secara anaerob. Suspensi *Fusobacterium nucleatum* yang akan diuji dibandingkan terlebih dahulu dengan larutan standar Mc Farland 0,5 untuk mengetahui konsentrasi suspensi bakteri. Suspensi *Fusobacterium nucleatum* diencerkan ditambahkan akuades steril atau larutan fisiologis NaCl 0,9% dan dihomogenkan di atas sentrifuge dan diukur absorbansinya dengan larutan standar Mc Farland 0,5 atau setara dengan 1,5 x 10⁸ CFU/m.

Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm

Pengujian penghambatan pembentukan biofilm dilakukan dengan metode *microtiter plate assay*. Suspensi bakteri dicampurkan dengan ekstrak etanol rimpang kencur (*Kaempferia galangal L.*) fraksi etil asetat sebanyak 50 µl dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25 mg/ml. Sebanyak 20 µl suspensi uji dimasukkan ke dalam 96 - *well round bottomed plastic tissue culture plate (microtiter plate)* yang berisi 130 µl *Brain Heart Infusion-broth (BHI-B)*, kemudian *plate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, isi *microplate* dikeluarkan dan dicuci dengan PBS steril sebanyak 3 kali. *Microplate* diberikan pewarna dengan memasukkan 20 µl larutan *crystal violet* 1% dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Selanjutnya *microplate* dicuci dengan PBS steril sebanyak 3 kali dan tunggu hingga kering pada suhu ruang. Etanol 96% sebanyak 200µl dimasukkan ke dalam *microplate* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Pengukuran penghambatan biofilm diukur menggunakan *microplate reader* pada densitas optik 595 [11]. Penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* dihitung menggunakan rumus sebagai berikut [11]:

$$\% \text{ penghambatan biofilm} = \frac{\text{DO Kontrol Pertumbuhan} - \text{DO Sampel}}{\text{DO Kontrol Pertumbuhan}} \times 100\%$$

Keterangan : DO (Densitas Optik)

Analisis Data

Data persentase penghambatan pembentukan biofilm bakteri *Fusobacterium nucleatum* merupakan data berskala numerik yaitu rasio. Analisis data dilakukan dengan software *Statistical Product and Service Solutions (SPSS)* versi 22. Sebelum dilakukan analisis, data diuji normalitasnya menggunakan *Shapiro-wilk* ($n \leq 50$) dan diuji homogenitasnya dengan *Levene test*. Data yang terdistribusi normal dan homogen dianalisis dengan uji parametrik *One-way ANOVA* dan dilanjutkan uji *Post hoc LSD* dengan taraf signifikansi 95%. Konsentrasi minimal penghambatan biofilm / *Minimum Biofilm Inhibition Concentration (MBIC)*, Konsentrasi MBIC pada penelitian ini menggunakan $MBIC_{50}$ ditentukan dari konsentrasi ekstrak terendah yang dapat menghambat pertumbuhan 50% biofilm bakteri *Fusobacterium nucleatum*. Analisis $MBIC_{50}$ dilakukan menggunakan analisis probit dengan aplikasi SPSS.

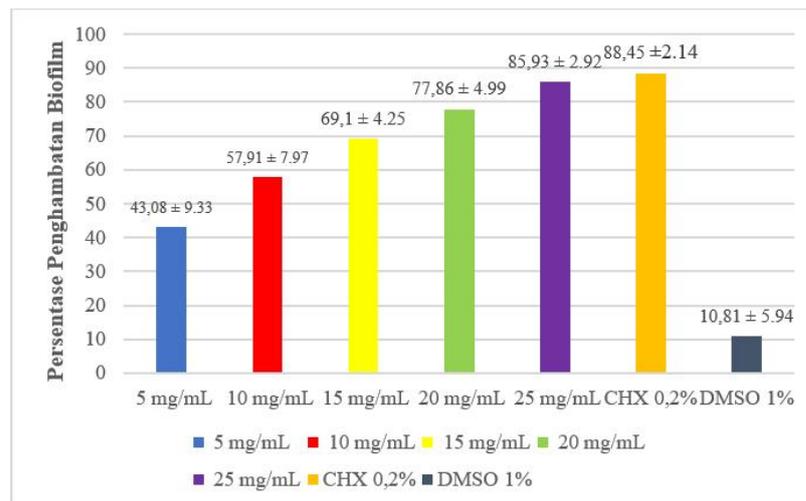
HASIL

Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur positif mengandung beberapa senyawa aktif polar yaitu flavonoid, tanin, dan fenol, dan senyawa aktif semi-polar yaitu saponin dan alkaloid berdasarkan uji dengan pereaksi kimia (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil Penapisan Fitokimia

No	Senyawa Fitokimia	Hasil	Interpretasi Hasil
1	Flavonoid	Terdapat perubahan warna menjadi kecoklatan	Positif
2	Tanin	Terdapat perubahan warna menjadi hijau kecoklatan	Positif
3	Saponin	Terbentuk buih	Positif
4	Alkaloid	Terdapat endapan berwarna kekuningan	Positif
5	Fenol	Terdapat perubahan warna menjadi kehijauan	Positif

Nilai persentase penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* pada perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur menunjukkan semakin tinggi konsentrasi mengakibatkan nilai persentase penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* juga semakin meningkat (Gambar 1). Nilai persentase penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* pada kelompok perlakuan P5 yaitu sebesar $85,93\% \pm 2,922$ sedangkan nilai persentase penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* terendah terdapat pada dosis 5 mg/mL yaitu sebesar $43,08\% \pm 9,333$.



Gambar 1. Grafik Rerata Persentase Penghambatan Pembentukan Biofilm *Fusobacterium nucleatum*

Hasil uji *one way Anova* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antar kelompok dengan nilai p sebesar 0,00 sehingga dilanjutkan uji *post hoc LSD*. Hasil uji *post hoc LSD* menunjukkan terdapat perbedaan pengaruh signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan P1, P2, P3, P4, dan P5 dengan kelompok KN dan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok P5 dengan kelompok KP (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Uji Post Hoc LSD

No	Kelompok	Nilai Signifikansi Uji Post Hoc LSD						
		5 mg/mL	10 mg/mL	15 mg/mL	20 mg/mL	25 mg/mL	KP	KN
1	5 mg/mL		0,002*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
2	10 mg/mL			0,014*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
3	15 mg/mL				0,048*	0,001*	0,000*	0,000*
4	20 mg/mL					0,066	0,019*	0,000*
5	25 mg/mL						0,552	0,000*
6	KP							0,000*
7	KN							

Keterangan : KP: Kontrol positif, KN: Kontrol negatif

*: Terdapat perbedaan signifikan antar kelompok ($p < 0,05$)

Pengujian pengaruh fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur terhadap penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* yang dilakukan menggunakan regresi probit dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ideal untuk persentase penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* yang mencapai 50%. Persamaan regresi probit yang dihasilkan adalah sebagai berikut:

$$\text{Penghambatan pembentukan biofilm (y)} = -0,450 + 0,062 * \text{konsentrasi}$$

Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur memiliki pengaruh positif terhadap penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* dengan koefisien regresi sebesar 0,062 dan nilai signifikansi sebesar 0,000. Berdasarkan hasil analisis probit dapat diketahui persentase penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* sebesar 50% terdapat pada konsentrasi 7,3 mg/mL.

DISKUSI

Hasil uji fitokimia terhadap fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur menunjukkan hasil bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur mengandung senyawa golongan flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, dan fenol. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang kencur mengandung flavonoid, polifenol, saponin, dan terpenoid yang menunjukkan potensi sebagai antibakteri [8].

Penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* pada penelitian ini diukur menggunakan *microplate reader* dengan pewarnaan kristal violet 1% pada panjang gelombang 595 nm dan menghasilkan adalah nilai densitas optik (DO). DO merupakan hasil pengukuran di bidang mikrobiologi yang menunjukkan pertumbuhan dari suatu mikroba dan pengukuran kuantitatif sebagai intensitas cahaya yang ditransmisikan sepanjang jalur melalui kultur dan nilainya berbanding lurus dengan ketebalan biofilm yang dihasilkan, artinya adalah semakin tinggi nilai DO yang dihasilkan, maka semakin tebal pula biofilm yang dihasilkan oleh bakteri *Fusobacterium nucleatum* [10].

Nilai DO yang telah didapatkan kemudian dihitung dengan rumus persentase penghambatan pembentukan biofilm untuk memperoleh persentase penghambatan biofilm *Fusobacterium nucleatum*. Persentase penghambatan biofilm *Fusobacterium nucleatum* terendah pada kelompok perlakuan terdapat pada kelompok kontrol negatif dan menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok lainnya, sedangkan persentase penghambatan biofilm *Fusobacterium nucleatum* tertinggi terdapat pada kelompok KP dan menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok lainnya, kecuali dengan kelompok perlakuan P5. Hasil yang diamati pada kelompok perlakuan fraksi etil asetat menunjukkan semakin besar konsentrasi dari fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur, maka semakin besar nilai persentase penghambatan biofilm *Fusobacterium nucleatum*. Faktor yang mempengaruhi terjadinya hal ini adalah karena adanya kandungan senyawa aktif antibiofilm pada rimpang kencur yaitu flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, dan fenol, sementara pada kelompok KN tidak mengandung senyawa antibakteri maupun antibiofilm.

Fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur mampu menghambat pembentukan biofilm karena mengandung beberapa senyawa aktif seperti golongan flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, dan fenol. Senyawa flavonoid mampu menghambat pembentukan biofilm bakteri *Fusobacterium nucleatum* dengan membuat enzim bakteri menjadi tidak aktif dan menyebabkan tidak terjadinya aktivitas enzim glukosiltransferase yang digunakan bakteri untuk mensistesis sukrosa dalam media menjadi glukosa, sehingga pembentukan biofilm menjadi terhambat karena jumlah glukosa sebagai media perlekatan bakteri menjadi sedikit atau terbatas. Flavonoid juga dapat mengganggu *Acyl-homoserine Lactones* (AHLs) sehingga *quorum-sensing* akan terhambat dan berdampak permanen pada perlekatan bakteri [12].

Kandungan senyawa aktif pada fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur yang juga memiliki peran penting dalam penghambatan pembentukan biofilm bakteri *Fusobacterium nucleatum* adalah saponin. Efek antibiofilm yang dimiliki oleh senyawa saponin terhadap bakteri *Fusobacterium nucleatum* adalah dengan menghambat perlekatan mikroba ke permukaan sehingga perkembangan biofilm menjadi terganggu. Perkembangan biofilm yang terganggu tersebut akan mempengaruhi struktur biofilm untuk meningkatkan pertahanan terhadap antimikroba. Saponin juga dapat merusak matriks EPS biofilm dan akan menyebabkan jalur komunikasi sel dan nutrisi antar mikroba terputus sehingga mikroba yang tadinya akan membentuk biofilm akan menjadi lisis atau mati, dikarenakan hilangnya nutrisi sebagai penyusun pembentukan biofilm [13].

Senyawa tanin juga terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur dan terbukti dapat

menghambat pembentukan biofilm. Efek antibiofilm yang dimiliki oleh senyawa tanin terhadap bakteri *Fusobacterium nucleatum* adalah dengan mengikat salah satu protein adhesin bakteri yang dipakai sebagai reseptor permukaan bakteri bersama dengan flavonoid, sehingga terjadi penurunan daya perlekatan bakteri dan menghambat sintesis protein untuk pembentukan dinding sel. Senyawa lain yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur yang juga terbukti mampu menghambat pembentukan biofilm bakteri adalah alkaloid. Senyawa alkaloid mampu menghambat pembentukan biofilm bakteri *Fusobacterium nucleatum* dengan mereduksi gen – gen inisiator pembentuk biofilm. Alkaloid dapat mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut [14].

Senyawa lain yang terkandung dalam fraksi etil asetat rimpang kencur adalah fenol. fenol menghambat pembentukan biofilm bakteri *Fusobacterium nucleatum* dengan membentuk ikatan kompleks dengan protein pada membrane (protein-fenol), sehingga mengakibatkan turunnya permeabilitas bakteri. Ikatan kompleks yang telah terbentuk ini kemudian akan terurai dan berpenetrasi ke dalam sel sehingga terjadi koagulasi protein dan menyebabkan enzim bakteri tidak aktif, sehingga proses pembentukan biofilm tidak terjadi. Dinding sel bakteri yang tidak terbentuk dengan baik ini akan mengalami kebocoran dan bakteri itu akan mati sehingga biofilm tidak terbentuk [14].

Nilai DO kelompok KN dalam penelitian ini yaitu $1,066 \pm 0,118$ dan nilainya tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$) dengan nilai DO kelompok KM yaitu $1,206 \pm 0,221$. Persentase penghambatan biofilm oleh DMSO 1% merupakan persentase terendah dibandingkan seluruh kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, hal ini menunjukkan bahwa DMSO 1% tidak mempengaruhi aktivitas penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum*. *Chlorhexidine gluconate* 0,2% dipilih sebagai kontrol positif karena *chlorhexidine gluconate* 0,2% merupakan obat kumur *gold standard* dalam perawatan periodontitis yang bertindak sebagai inhibitor biofilm spesifik bakteri patogen periodontal, salah satunya *Fusobacterium nucleatum*. Perbedaan tidak signifikan antara kelompok KP dengan kelompok perlakuan P5 menunjukkan arti bahwa kelompok perlakuan fraksi etil asetat rimpang kencur konsentrasi 25 mg/ml memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan biofilm bakteri *Fusobacterium nucleatum* yang hampir menyerupai *chlorhexidine gluconate* 0,2%. Hal ini dikarenakan adanya kesamaan mekanisme senyawa aktif flavonoid pada fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur dengan mekanisme *chlorhexidine gluconate* 0,2% sebagai antibiofilm, yaitu dengan menembus EPS bakteri penyusun biofilm sehingga dapat mengganggu stabilitas membran biofilm dan dapat menghancurkan biofilm [15]. Persentase penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* kelompok perlakuan P4 tidak berbeda bermakna dengan kelompok perlakuan P5 ($p > 0,005$), namun masih terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan P4 dengan kelompok KP ($p < 0,005$). Hasil ini menandakan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur pada konsentrasi 20 mg/mL memiliki aktivitas penghambatan pembentukan biofilm yang hampir sama dengan konsentersasi 25 mg/mL, namun masih belum dapat menyamai persentase penghambatan pembentukan biofilm yang dilakukan oleh *chlorhexidine gluconate* 0,2%, sehingga pada konsentersasi 20 mg/mL belum dapat dinyatakan sebagai konsentersasi efektif.

Indikator dari penghambatan biofilm dapat dilihat menggunakan *Minimum Biofilm Inhibition Concentration* (MBIC) menggunakan $MBIC_{50}$. $MBIC_{50}$ merupakan konsentrasi minimal dari suatu obat ataupun ekstrak yang dapat menghambat pembentukan biofilm sebesar 50%. Penentuan konsentrasi $MBIC_{50}$ dalam penelitian ini menggunakan analisis probit dan didapatkan hasil persentase penghambatan pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* oleh fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur yang mencapai 50% adalah sebesar 7,3 mg/mL.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, simpulan yang dapat diambil yaitu terdapat aktivitas fraksi etil ekstrak etanol rimpang kencur dalam menghambat pembentukan biofilm *Fusobacterium nucleatum* dan terdapat perbedaan aktivitas antara konsentrasi 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL 20 mg/mL dan 25 mg/mL. Kemampuan fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur konsentrasi 25 mg/mL dalam menghambat pembentukan biofilm *F. nucleatum* sama dengan kemampuan kontrol positif *chlorhexidine gluconate* 0,2% sehingga dapat dikembangkan sebagai terapi adjuvant dalam mencegah terjadinya periodontitis. Konsentrasi $MBIC_{50}$ dari fraksi etil asetat ekstrak etanol rimpang kencur dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *Fusobacterium nucleatum* adalah 7,3 mg/mL.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian maupun penulisan.

REFERENSI

- [1] Kusuma, R. A., Azizah, S. N., Utami, N. D. Periodontitis Kronis Disertai Kebiasaan Mengunyah Pada Satu Sisi. *Mulawarman Dental Journal* 2021; 1 (1) : 17 – 24.
- [2] Newman MG, Carranza FA, Takei HH, et al. *Clinical Periodontology*. 13th ed. Philadelphia: Elsevier, 2019..
- [3] Saputri, B. A. N. 2023. Aktivitas Ekstrak Etanol Rimpang Kencur (*Kaempferia galangal* L.) Terhadap Degradasi Biofilm *Fusobacterium nucleatum* Penyebab Periodontitis Kronis. *Skripsi*. Universitas Jenderal Soedirman. (Tidak Dipublikasikan)
- [4] Adrianto, A. W. D., Hartomo, B. T., Putri, D., A. Variasi Oral Microbiome Rongga Mulut Sebagai Bimarker

- Pada Bidang Kedokteran Gigi: Literature Review. *Indonesian Journal of Dentistry* 2022; 2 (1) : 1 – 6.
- [5] Ristianti, N., Kusnanta, J. W., Marsono. Perbedaan Efektivitas Obat Kumur Herbal Dan Non Herbal Terhadap Akumulasi Plak Di Dalam Rongga Mulut. *Medali Jurnal* 2020; 2 (1) : 31 – 37.
- [6] Haerazi, A., Jekti, D. S. D., Andayani. Y. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kencur (*Kaempferia Galangal* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus Aureus* Dan *Streptococcus Viridans*. *Jurnal Ilmiah Biologi a "Bioscientist"* 2020; 2 (1) : 1 – 11.
- [7] Fajeriyati, N. Andika, A. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Rimpang Kencur (*Kaempferia Galangal* L.) Pada Bakteri *Bacillus Subtilis* Dan *Escherichia Coli*. *Journal of Current Pharmaceutical Science* 2017; 1 (1) : 36 – 41.
- [8] Alam, G. Tayeb, R. Fraksinasi Dan Uji Toksisitas Ekstrak Metanol Bintang Laut (*Protoreaster Nodulus* w.) Terhadap Larva *Artemia Salina* Leach. *Pharmakon* 2003; 4 (2) : 48 – 52.
- [9] Sukandar, T.K., Sukmiwati, M. and Diharmi, A. Active Fraction Of Brown Seaweed *Sargassum Cinereum*. *Berkala Perikanan Terubuk* 2021; 49(3):1363-1369.
- [10] Rosyada, A. G., Prihastuti, C. C, Sari, D. N. I., Setiawati, Ichsyani, M., Laksitasari, A., Andini, R. F., Kurniawan, A. A. Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Etanol Kulit Bawang Merah (*Allium Cepa* L.) Dalam Menghambat Pembentukan Biofilm *Staphylococcus Aureus* Atcc 25923: Penelitian Eksperimental Laboratoris. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjajaran* 2023; 35 (1) : 33 – 41.
- [11] Federika, A. S., Rukmo, M. Setyabudi, S. Antibiofilm Activity Of Flavonoid Mangosteen Pericarp Extract Against *Porphyromonas Gingivalis* Bacteria. *Conservative Dentistry Journal* 2020; 10 (1) : 27 – 30.
- [12] Hamzah, H. Hertiani, T. Pratiwi, S. U. T., Nuryastuti, T. Efek Saponin Terhadap Penghabatan Planktonic Dan Mono-Spesies Biofilm *Candida Albicans* Atcc 10231 Pada Fase Pertengahan, Pematangan, Dan Degradasi. *Majalah Farmaseutik* 2021; 17 (2) : 198 - 205.
- [13] Kining, E. Falah, S. Nurhidayat, N. The In Vitro Antibiofilm Activity Of Water Leaf Extract Of Papaya (*Carica Papaya* L.) Against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Current Biochemistry* 2016; 2 (3) : 150 – 163.
- [14] Kusumawati, E., Apriliana, A. and Yulia, R. Kemampuan Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Nangka (*Atrocarpus heterophyllus* Lam.) terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Sains dan Kesehatan* 2017; 1(7), pp.327-332.